

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-252300

(43) 公開日 平成7年(1995)10月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 19/00		8318-4H		
14/02		8318-4H		
16/08		8318-4H		
C 1 2 N 7/02		9281-4B		
		9281-4B		
		C 1 2 N 15/ 00		Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数16 書面 (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-79181

(22) 出願日 平成6年(1994)3月11日

(71) 出願人 391039391

株式会社イムノ・ジャパン

東京都杉並区荻窪4丁目28番14-701号

(72) 発明者 岡本 宏明

栃木県河内郡南河内町薬師寺3132-24

(74) 代理人 弁理士 中島 敏

(54) 【発明の名称】 ダック肝炎ウイルスとヒト肝炎ウイルスの抗原融合蛋白質および製造方法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、精製分離が容易であるとともに、モノクローナル抗体を用いたヒト肝炎ウイルス測定系を構築可能な発現系を開発することを目的とする。

【構成】 本発明は、ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結してなる組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して得る融合蛋白質の発明であり、その抗原融合蛋白質の製造法の発明、該融合蛋白質を用いた抗体検査キットおよび抗体検出方法の発明である。

【効果】 本発明の融合蛋白質は、回収・分離・精製が容易であるとともに、粒子の主要構成成分であるダックHBc蛋白質がヒトHBc抗体とは反応性を有しないので、外来遺伝子にのみ高い特異性を有する融合蛋白質が得られ、所望の目的を達成できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結してなる組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して得ることを特徴とする融合蛋白質。

【請求項2】組み換え遺伝子がダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子塩基配列1～261番と同379～789番を発現ベクターとして使用し、該発現ベクター内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結した組み換え遺伝子である請求項1記載の融合蛋白質。

【請求項3】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのe抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項4】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのx遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項5】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのアレコア抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項6】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS1抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項7】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS2抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項8】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して融合蛋白質を得ることを特徴とする抗原蛋白質製造法。

【請求項9】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子塩基配列1～261番と同379～789番を発現ベクターとして使用し、該発現ベクターにヒト肝炎ウイルス遺伝子を結合した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入する請求項8記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項10】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのe抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項11】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのx遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項12】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのアレコア遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項13】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS1抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項14】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS2抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項15】請求項1ないし7記載の融合蛋白質を用

いた抗体検査キット。

【請求項16】請求項1ないし7記載の融合蛋白質を用いる抗体検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、ダックB型肝炎ウイルス（以下「DHBV」と略称する）コア抗原（以下「DHBc抗原」と略称する）遺伝子を含む発現ベクターを用い、これにヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結して作成した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入し、これを発現させて得られる融合蛋白質の発明、および製造方法の発明、ならびに得られた融合蛋白質の利用に関する発明である。

## 【0002】

## 【従来の技術】

肝炎ウイルス抗原は、従来からワクチンとして、あるいはウイルス性肝炎診断薬の材料として用いられてきた。これには、ウイルスそのものを使用したもの、ウイルスの一部構成成分を精製、分離したもの、ウイルス抗原の一部のアミノ酸配列を採用した合成ペプチド、さらにはウイルス遺伝子の組み換え体を発現させた蛋白質等があった。

## 【0003】

しかしながら、ウイルスそのものやその構成成分を精製し、これを抗原として利用する場合には、ウイルス感染患者の血液を材料として使用しなければならないことから、材料の安定供給や回収作業の手間等に問題があり、さらに安全性の点にも不安を免れないことが指摘されていた。

他方、合成ペプチドを用いる場合には、二次構造の模倣のみでは抗原の立体構造に由来する抗原性が獲得できず、期待された抗原性が得られないという問題があった。

## 【0004】

これに対し、ウイルス遺伝子を宿主細胞遺伝子に組み込み、これを発現させて製造した組み換え体抗原蛋白質を使用する場合は、大量製造が可能で安定供給が期待できるとともに安全性についての不安も低いので、種々の細胞を用いた多様な発現系を用いる例が報告されている。しかしながら、組み換え体を用いる場合には、抗原の種類や宿主細胞の種類によっては発現蛋白質が抗原特異的な立体構造を構築できず、その結果、免疫原性や抗原性を十分に発揮されないことが指摘されている。このため、発現を希望する抗原毎に発現系を検討し、選択することが必要であった。さらに、抗原単独の発現を行った場合には、分子量が比較的小さな抗原のときに精製分離が困難になるという問題があった。

## 【0005】

ヒトB型肝炎ウイルス（以下「HBV」と略称する）コア抗原（以下「HBc抗原」と略称する）遺伝子は、そのアミノ基端側、カルボキシル基端側、あるいは中間位

置に他の外来遺伝子を挿入・連結することができ、適当なベクターを用いて宿主細胞に導入することができる。これによってHBc抗原蛋白質と外来遺伝子由来蛋白質を同時に発現することができ、かつ発現されたHBc抗原はコア蛋白質よりなる粒子を形成し、外来遺伝子由来の蛋白質はその表面上に表出した形で発現されるので、抗原を精製分離する担体として有用である。また粒子表面に多数のエピトープを発現できるので、単一エピトープにのみ結合するモノクローナル抗体を利用した測定系とすることが可能となる。これらのことから、外来遺伝子のベクターへの導入の際の連結遺伝子として好適であることが知られている。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

以上のように、HBc抗原遺伝子は外来遺伝子のベクター導入に際しての連結遺伝子として優れた特性を有するが、しかしヒトHBc抗原遺伝子を使用した場合には発現されて粒子を形成するヒトHBc抗原自体が抗原性を有することから、ヒトまたはヒトと交叉性を有するHBc抗原をもつ動物の診断には利用できなかった。このため、ヒトHBc抗原との交叉反応性をもたない外来遺伝子発現蛋白質をコア粒子表面に発現することにより、精製分離が容易であるとともにモノクローナル抗体を用いた測定系を構築することが可能な発現系を開発することが期待されていた。

#### 【0007】

##### 【課題を解釈するための手段】

本発明者は、ヒトまたはヒトと交叉性を有するHBc抗原をもつ動物の診断にも利用可能な融合蛋白質発現系の開発研究を進めた結果、DHBc抗原がヒトHBc抗原とは交叉反応性を有さず、かつ、その遺伝子配列中にヒトHBc抗原遺伝子には存在しない遺伝子配列を有することから、DHBc抗原遺伝子を用いることによって上記目的に適した多様な融合蛋白質を発現することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

#### 【0008】

かかる知見から、本発明者は、DHBc抗原遺伝子の中間領域を取り去り、この領域にヒトHBc抗原遺伝子、ヒトHBVx遺伝子、ヒトHBVアレコア遺伝子、ヒトHBVアレS1抗原遺伝子、ヒトHBVアレS2抗原遺伝子等の種々の外来遺伝子を挿入し、連結した組み換え体遺伝子を作成し、宿主細胞に導入・発現させて得たDHBc抗原と外来遺伝子蛋白質よりなる融合蛋白質、ならびにその製造方法、およびその利用に関する発明を完成した。

#### 【0009】

本発明でDHBc抗原遺伝子は、例えば262番目の塩基から376番目までの塩基間での中間領域を取り去ったものを使用するのが好適である。

#### 【0010】

本発明の融合蛋白質、その製造方法および利用について概略的に説明すれば、次のとおりである。

DHBV陽性血清からクローニングしたDHBV DNAを鋳型とし、ヌクレオチドプライマーを用いてDHBV抗原遺伝子を遺伝子増幅法（以下「PCR」と略称する）によって増幅する。

好適なヌクレオチドプライマーとしては、配列番号1ないし4に示されるものである。

#### 【0011】

10 本発明で発現ベクターとして使用するDHBVは、北京ダックより発見されたDNAウイルスであり、1980年にMasonらによって報告された(Mason, W. S. et al. Journal of Virology. 36)。

DHBVは、肝臓を主たる増殖の場とする点でヒトHBVと類似し、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)、地リス肝炎ウイルス(GSHV)やヒトHBVとともに「ヘパドナウイルス」と総称される。

20 遺伝子の基本的構造やウイルス粒子の形態学的な特徴等は上記4種のヘパドナウイルスがよく類似しているが、DNA塩基配列の相同性は、哺乳動物のウイルスであるヒトHBV、WHV、GSHVは相互に60～70%の相同性がみられるのに対し、鳥類のウイルスであるDHBVはヒトHBVに対して40%以下の相同性しかもない。

本発明に用いるコア領域は、ヒトHBV、WHV、GSHVが183～188個のアミノ酸から構成されているのに対し、DHBVでは262個のアミノ酸からなる。

#### 【0012】

30 本発明においては、DHBVウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルスを連結するが、使用するDHBVウイルスのコア抗原遺伝子としては塩基配列1～261番と379～789番のものが好ましい。配列1～261番の例を配列番号17に、塩基配列379～789番の例を配列番号18に示すが、もとより本発明には変異により配列に変動があったものも含まれる。

#### 【0013】

40 得られた増幅遺伝子をNcoI、EcoRI、SalI、PstIの制限酵素で処理した後、プラスミドベクターであるpTc99AのNcoI、EcoRI部位およびSalI、PstI部位に挿入し、DHBcの1～87アミノ酸配列と127～263アミノ酸配列を有し、88～126アミノ酸配列を欠いて、上記欠如部分にEcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamHI、XbaI、SalIの制限酵素部位からなるマルチクローニング部位を有する発現ベクターpKA215を得る。

#### 【0014】

50 他方、ヒトHBVの各抗原遺伝子を特異プライマーを用いて増幅し、EcoRIならびにSalIの制限酵素で

5

処理したのち、マルチクローニング部位を有する発現ベクターpKY215のEcoRIまたはSalIの制限酵素部位に挿入して各抗原遺伝子発現用の発現ベクターを作成する。

## 【0015】

ヒトHBVの抗原遺伝子としては、e抗原遺伝子、x遺伝子、プレコア抗原遺伝子、プレS1抗原遺伝子、プレS2抗原遺伝子等を使用することができる。

これら抗原遺伝子の配列は配列番号12ないし16に示されるが、変位にもとづいて配列番号に変動があったものも本発明に含まれる。

また、本発明はB型以外のヒト肝炎ウイルス、例えばC型肝炎ウイルスの抗原遺伝子についても適用することができる。

## 【0016】

得られた発現ベクターは、例えば大腸菌(MC1061)に塩化カルシウム法でトランスフォームし、1mMのIPTGによって融合蛋白質の発現を誘導する。その後、大腸菌を集菌し、リゾチーム処理、超音波処理して溶菌し、硫酸沈澱、PEG沈澱、ショ糖密度勾配遠心分離法等公知の方法により精製する。

## 【0017】

本発明の発現ベクター構築に用いるベクターとしては、大腸菌のほか、酵母、動物培養細胞等を宿主細胞として融合蛋白質を発現することが可能なものであればいずれであってもよい。その際使用ベクターに特異的な制限酵素部位、ならびにクローニング部位に適合した制限酵素の使用が必要である。

## 【0018】

本発明におけるDNA技術、HBV抗原発現技術は公知のものを使用すればよく、例えば前者についてはMolecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989記載の方法、後者についてはNature 291 503-506, 1981, J. Virol. Methods, 6 51-70, 1986, Gene 46 135-141, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 1, 1982等記載の方法に準拠して実施できる。

## 【0019】

宿主細胞へ発現ベクターをトランスフォームする方法は、導入遺伝子が発現し、目的の融合蛋白質が生産可能ないかなる方法も利用できる。その方法の例としては、エレクトロポレーション法、燐酸カルシウム法等がある。

## 【0020】

トランスフォームした細胞株の取得および培養は、公知の方法、例えばCytotechnology, 3, 133, 1990記載の方法に準じて行うことができる。

6

培地は、大腸菌、酵母、動物細胞等に使用可能なものを利用できる。

## 【0021】

培養後、培養液から細胞を分離し、破壊し、融合蛋白質を精製する方法としては、公知の技術を採用することができる。融合蛋白質の測定は、発現蛋白質をショ糖密度遠心分離法で分子量よりHBc抗原蛋白質粒子と同等の密度を有する分画を得た後、これを試料として目的とする外来遺伝子によりコードされる蛋白質に対する抗体を用いたエンザイム・イムノ・ソルベント・アッセイ法(以下「ELISA」と略称する)により行うことができる。

## 【0022】

本発明の融合蛋白質は、ヒト肝炎ウイルスに対する抗体検査に使用することができ、本発明の融合蛋白質は、これを含む抗体検査キットとして用いることができる。

## 【0023】

## 【作用】

本発明の融合蛋白質は、その密度からコア粒子と融合した形で発現していると推定され、その精製が比較的容易である。

また、導入した外来遺伝子であるヒト肝炎ウイルス遺伝子の発現蛋白質に反応するとともに、粒子の主要構成成分であるコア蛋白質はヒト肝炎ウイルス抗体とは反応性を有しないことが判明した。

したがって、本発明の融合蛋白質は、DHBc蛋白質より成るコア粒子を担体とし、その粒子表面に例えばHBVのe抗原遺伝子、x遺伝子、プレコア抗原遺伝子、プレS1抗原遺伝子、プレS2抗原遺伝子その他の導入遺伝子抗原を表出すると推認されるので、導入遺伝子由来の蛋白質にのみ高い抗原特異性を有する。

このため、本発明の融合蛋白質は、抗体誘導担体、検体検査薬として有効に用いることができる。

## 【0024】

本発明によって、とくに高いヒトHBe抗原特異性を有する融合蛋白質を得ることができる。すなわち、ヒトHBe抗原をコードする遺伝子は、ヒトHVC抗原をコードする遺伝子と同一の読み取り枠に由来し、異なる翻訳開始点を有する蛋白質であるため、アミノ酸配列の大部分が同一であり、このために特異性の高いHBe抗原を得ることは、従来非常に難しい作業であった。

これに対し、本発明においては、HBc抗原遺伝子として、ヒトHBc抗体とは反応性を有しないDHBc抗原遺伝子を利用する。このため、ヒトHBe抗原特異性の高い融合蛋白質が得られる。

## 【0025】

## 【実施例】

## (実施例1)

DHBc/ヒトHBV遺伝子発現ベクターの構築

(1) ヒトHBe抗原遺伝子の場合

配列番号5および6の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1814から2347番間の領域を含むヒトHBe抗原遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素(EcoRI)にて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRI部位に挿入してヒトHBe抗原融合蛋白質発現ベクターpYA296を作成した(図1a)。

## 【0026】

## (2) ヒトプレS1抗原遺伝子の場合

配列番号7および8の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列2848から3204番間の領域を含むヒトプレS1抗原遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトプレS1融合蛋白質発現ベクターpYA301を作成した(図1b)。

## 【0027】

## (3) ヒトHBx遺伝子の場合

配列番号9および10の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1374から1835番間の領域を含むヒトHBx遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBx融合蛋白質発現ベクターpYA299を作成した(図1c)。

## 【0028】

## (4) ヒトHBVアレコア遺伝子の場合

配列番号5および11の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1814から1900番間の領域を含むヒトHBVアレコア遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBVアレコア融合蛋白質発現ベクターpYA297を作成した(図1d)。

## (5) ヒトプレS2抗原遺伝子の場合

クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列3205から154番間の領域を含むヒトHBVアレコア遺伝子の増幅を行った。増幅後制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBVアレS2融合蛋白質発現ベクターpYA298を作成した(図1e)。

制限酵素はBoehringer Mannheim社(ドイツ)、NEB社(アメリカ)、宝酒造社のものを、DNAリガーゼ、フォファターゼは宝酒造社のものを用いた。

## 【0029】

## (実施例2)

DHBc/ヒトHBV融合蛋白質の発現と精製

実施例1で得られた発現ベクターpYA296、pYA301、pYA299pYA297、あるいはpYA298を大腸菌MC1061(Stratagene社、アメリカ)に導入し、1夜培養した後、その100分の1量を新しい培養液(NB培地、栄研化学社)に移して2-3時間培養し、IPTG(Nova社)を1mM相当加えてさらに4-16時間培養し導入遺伝子の発現を誘導した。培養終了後、集菌し、リゾチーム処理を行った。リゾチーム処理は、50mMグルコース、10mM

EDTA、25mM Tris-HCl(pH8.0)、リゾチーム4mg/ml(生化学工業社:Lysozyme, Egg white)溶液を溶菌量の約10倍加え、懸濁し、室温に30分放置した後、10,000rpmにて20分間遠心分離した。遠心分離後、沈澱物に2% NP40、1mM PMSF、0.1%NaN<sub>3</sub> 10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTAを10倍量加え、一晚4℃で攪拌した。

## 【0030】

その後、DNase(Boehringer Mannheim社製:DNase I, GradeII)を最終濃度10μg/mlになるよう加え、室温1時間攪拌反応させDNAを切断した。10,000rpm、20分間の遠心分離で沈澱を得た後、1mM EDTAの緩衝液を約10倍量加え、超音波処理した。超音波処理はBranson Sonic Power Co.のSonifier model 350を用い、Micro tip, 出力7、duty50%の条件にて5分間実施した。更に、10,000rpmの遠心分離を20分間行い、得られた上清に先のDNase処理した上清を加え一つにした。この上清に硫酸を加え35%硫酸分画沈澱を得た。更に10%ポリエチレングリコール沈澱を行い、50mMTris-HCl(pH 7.5)、0.9%NaCl、1mM PMSF、0.1%NaN<sub>3</sub>緩衝液に溶かした後、60%ショ糖7ml、40%ショ糖10mlを重層し、Beckmann SW28ローターで、26,000rpm、4℃にて16時間遠心分離し、1mlずつ分画し融合蛋白質試料とした。

## 【0031】

## (実施例3)

DHBc/ヒトHBe融合蛋白質の抗原特異性を、次の方法に従い各種、ヒトHBV抗体を用いて確認した。各種の抗ヒトHBe抗体または抗ヒトHBc抗体を固相

した容器にDHBc/ヒトHBe融合蛋白質を反応させた後、酵素標識した各種の抗ヒトHBe抗体または抗ヒトHBc抗体を反応させた。抗ヒトHBe抗体としてモノクローナル抗体904(a)、905(b)、C71-17の3種を、抗ヒトHBc抗体としてモノクローナル抗体3105( $\alpha$ )、3120( $\beta$ )の2種を用いた。

96穴マイクロプレートの各ウエルに固相用のモノクローナル抗体(20 $\mu$ g/ml・PBS)を加えて吸着させた後、融合蛋白質溶液50 $\mu$ lを加え室温にて1時間10

\* (リン酸緩衝生理食塩水)にて洗浄し、HRP標識した各モノクローナル抗体を加え1時間反応させた後、OPDを加えて492nmの吸光度を測定した。

【0032】

その結果、表1に示すように融合蛋白質は抗ヒトHBe抗体とのみ反応し、抗ヒトHBc抗体とは反応しないことから、コア粒子を形成するDHBc蛋白質は抗ヒトHBc抗体とは反応せず、ヒト由来の検体を用いる測定系に影響を与えないことが判明した。

【0033】

【表1】

固相抗体特異性	標識抗体特異性	492nm吸光度
ヒトHBe(a)	ヒトHBe(b)	>2.0
ヒトHBc( $\alpha$ )	ヒトHBc( $\beta$ )	0.005
ヒトHBc( $\beta$ )	ヒトHBcC71-17	0.05
ヒトHBcC71-17	ヒトHBe(b)	>2.0
ヒトHBcC71-17	ヒトHBcC71-17	0.279

【0034】

(実施例4)

本発明の各種融合蛋白質の抗原性の確認は、それぞれ次の抗体を用いて実施例3の方法に従いサンドイッチアッセイにより行った。

DHBc/ヒトHBx融合蛋白質についてはTrp-x融合発現蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、バンドを切り出し、抽出、生成した17kD蛋白質を抗原として得たモノクローナル抗体9153、9190を用いた。

DHBc/ヒトHBアレコ融合蛋白質についてはHBcのメチオニンを1番目とした場合の-11から-1に相当するアミノ酸配列(アレコ領域のアミノ酸配列)を有する合成ペプチドに対するモノクローナル抗体Pre-C5、Pre-C14およびモルモットにて作成したポリクローナル抗体を用いた。

DHBc/ヒトHBアレS1融合蛋白質については合成ペプチド(塩基配列2848-3204に相当するアミノ酸配列を有する)に対するモノクローナル抗体T0606とDane粒子を免疫して得られたモノクローナル抗体6870を用いて確認した。

DHBc/ヒトHBアレS2融合蛋白質についてはモノクローナル抗体を用いた市販のアレS2抗原測定用ELISAキット(株式会社特殊免疫研究所社製)を使用して確認した。

その結果、いずれの融合蛋白質もヒトHBVに由来する抗原性を有していることが確認された。

※【0035】

(実施例5)

DHBc/ヒトHBe融合蛋白質を用いて、ヒト血清中のHBe抗体を次のようにして測定した。

96穴マイクロプレートの各ウエルに固相用のモノクローナル抗体904(20 $\mu$ g/ml・PBS)を加えて吸着させた後、DHBc/ヒトHBe融合蛋白質溶液50 $\mu$ lを加え室温にて1時間反応させた。0.05%Tween 20を含むPBS(リン酸緩衝生理食塩水)にて洗浄し、1Mまたは2Mの尿素を含むPBSで100倍に希釈したヒト血清50 $\mu$ lを添加し室温にて1時間反応させた。再び洗浄し、HRP標識のウサギ由来抗ヒトIgG抗体を添加し、室温にて1時間反応させた後、OPDを加えて492nmの吸光度を測定した。抗原特異性の確認のため市販のHBe抗体測定用EIAキット「イムニスHBeAg/AbEIA」、ならびにHBe抗体測定用PHAキット「マイセルHBeAg/Ab」(いずれも株式会社特殊免疫研究所社製)を用いて同じヒト血清検体のHBe抗体を測定した。

本発明の融合蛋白質を用いた測定方法における陽性判定をOD492 $\geq$ 0.5としたとき、既存のキットと同等あるいはそれ以上の検出感度を示すことが明らかとなり、本発明の方法がヒト血清中のHBe抗体測定に有用であることが確認された。

【0036】

【表2】

※

検体No	イムニス EIA HBe 抗原/HBe抗体	マイセルPHA HBe 抗原/ HBe 抗体	融合蛋白ELISA 吸光度 判定
1	>3000 /	+ /	345 -
2	>3000 /	+ /	330 -
3	>3000 /	÷ /	80 -
4	>3000 /	+ /	362 -
5	>3000 /	÷ /	357 -
6	>3000 /	÷ /	203 -
7	>3000 /	+ /	432 -
8	>3000 /	+ /	343 -
9	>3000 /	+ /	268 -
10	>3000 /	+ /	167 -
11	>3000 /	+ /	461 -
12	14 +	/ +	718 +
13	>3000 /	+ /	222 -
14	26 ÷	/ +	883 +
15	>3000 /	+ /	253 -
16	>3000 /	+ /	298 -
17	21 ÷	/ +	1109 +
18	>3000 /	+ /	277 -
19	>3000 /	+ /	108 -
20	>3000 /	+ /	189 -

13			14		
21	>3000	/	+	/	215 -
22	>3000	/	+	/	188 -
23	34	÷	/	+	830 ÷
24	>3000	/	+	/	181 -
25	>3000	/	+	/	136 -
26	12	+	/	÷	838 ÷
27	12	+	/	+	1000 ÷
28	14	+	/	÷	619 ÷
29	14	+	/	+	355 -
30	727	42%阻害	+	/	899 ÷
31	185	+	-	-	546 -
32	42	/	/	+	525 ÷
33	>3000	/	-	/	267 -
34	>3000	/	+	/	248 -
35	>3000	25%阻害	-	/	445 -
36	868	/	-	-	561 ÷
37	24	/	/	+	897 ÷
38	27	/	/	-	356 -
39	10	/	/	±	795 -
40	14	/	/	±	472 -
41	2938	/	-	/	482 -
42	9	+	/	÷	652 ÷
43	>3000	/	+	/	257 -
44	2749	/	+	/	376 -
45	14	+	/	-	264 -
46	26	+	/	-	464 -
47	>3000	-	-	/	444 -
48	>3000	-	+	/	213 -

(注) 吸光度。OD値×1000。

500 以上を÷と表示

## 【0037】

## 【発明の効果】

本発明の融合蛋白質は、粒子の主要構成成分である、DHBc蛋白質からなるコア蛋白質がヒトHBc抗体とは反応性を有しない。このため、外来遺伝子由来の蛋白質にのみ高い抗原特異性を有する融合蛋白質を得ることができる。とくに、外来遺伝子としてヒトHBc特異遺伝子を導入した場合、高いヒトHBc抗原特異性を有する融合蛋白質が得られる。

40\* このため、本発明の融合蛋白質は、高い抗原性を有する抗原として、抗原測定試薬の素材や抗体誘導の試料として有効に使用できる。

また、本発明の融合蛋白質製造法は、発現蛋白質の回収・分離・精製が容易であり、かつ通常モノクローナル抗体を用いた測定系の開発が困難な抗原の測定法にも利用可能な抗原の製造方法としても有用である。

## 【0038】

## 【配列表】

\*



15

配列番号: 1

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

AACCCATGGA TATCAATGCT TCTAGAGCC

【0039】

配列番号: 2

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

CAAGAATTCC GGTGGAACAG GAGTAGTAG

【0040】

配列番号: 3

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

CAAGTCGACG CTCATTTGAA AGCTTATGC

【0041】

配列番号: 4

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

AACCTGCAGT TATTTCTAG GCGAGGGAG

【0042】

17  
配列番号: 5  
配列の長さ: 27  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
AACGAATTCA TGCAACTTTT TCACCTA

## 【0043】

配列番号: 6  
配列の長さ: 30  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
AACGAATTCA ACAACAGTAG TTTCCGGAAG

## 【0044】

配列番号: 7  
配列の長さ: 30  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
ACGAATTCAT GGGAGGTTGG TCTTCCAAAC

## 【0045】

配列番号: 8  
配列の長さ: 29  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
AACGTCGACG GCCTGAGGAT GACTGTCTC

## 【0046】

19  
配列番号: 9  
配列の長さ: 27  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
CAAGAATTCA TGGCTGCTCG GGTGTGC

【0047】

配列番号: 10  
配列の長さ: 28  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
CAAGTCGACG GCAGAGGTGA AAAAGTTG

【0048】

配列番号: 11  
配列の長さ: 27  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ヒトHBV

配列  
AACGTCGACG CCCCAAAGCC ACCCAAG

【0049】

21  
 配列番号: 12  
 配列の長さ: 534  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直線状  
 配列の種類: cDNA to genomic RNA (Hbe insert)

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCTACTGT TCAAGCCTCC 60  
 AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGGCATG GACATTGACC CGTATAAAGA ATTGGAGCT 120  
 TCTGTGGAGT TACTCTCTTT TTGGCCTTCT GACTTCTTTC CTCTATTTCG AGATCTCCTC 180  
 GACACCGCCT CTGCTCTGTA TCGGGAGGCC TTAGAGTCTC CGGAACATTG TTCACCTCAC 240  
 CATACAGCAC TCAGGCAAGC TATTCTGTGT TGGGGTGAGT TGATGAATCT GGCCACCTGG 300  
 GTGGGAAGTA ATTTGGAAGA CCCAGCATCC AGGGAATTAG TAGTCAGCTA TGTCAATGTT 360  
 AATATGGGCC TAAAAATCAG ACAACTATTG TGGTTTACA TTCTCTGTCT TACTTTTGGG 420  
 AGAGAAACTG TTCTTGAGTA TTTGGTATCT TTTGAGTGT GGATTCGCAC TCCTCCAGCT 480  
 TACAGACCAC CAAATGCCCC TATCTTATCA ACACCTCCGG AAACCTACTGT TGT 534

## 【0050】

配列番号: 13  
 配列の長さ: 462  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直線状  
 配列の種類: cDNA to genomic RNA (HBx insert)

ATGGCTGCTC GGGTGTGCTG CCAACTGGAT CCTTCGGGG ACCTCCTTTG TCTACGTCCC 60  
 GTCGGCGCTG AATCCCGCGG ACGACCCGTC TCGGGGCCGT TTGGGGCTCT ATCGTCCCT 120  
 TCTTCATCTG CCGTTCGGG CGACCACGGG GCGCACCTCT CTTTACGGG TCTCCCGTC 180  
 TGTGCTTCT CATCTGCCG ACCGTGTGCA CTTGCTTCA CCTCTGCAG TCGCATGGAG 240  
 ACCACCGTGA ACGCCACCA GGTCTTGCCC AAGGTCTTAC ATAAGAGBAC TCTTGGACTC 300  
 TCATCAATGT CAACGACCGA CCTTGAGGCA TACTTCAAAG ACTGTTTGT TAAGGACTGG 360  
 GAGGAGTTGG GGGAGGAGAT TAGGTAAAG GTCTTTGTAC TAGGAGGCTG TAGGCATAAA 420  
 TTGGTCTGTT CACCAGCACC ATGCAACTTT TTCACCTCTG CC 462

## 【0051】

配列番号: 14  
 配列の長さ: 87  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直線状  
 配列の種類: cDNA to genomic RNA (PreCore insert)

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCTACTGT TCAAGCCTCC 60  
 AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGG 87

## 【0052】

23

配列番号: 15

配列の長さ: 357

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to genomic RNA (PreS1 insert)

```

ATGGGAGGTT GGTCTTCCAA ACCTCGACAA GGCATGGGGA CGAATCTTTC TGTTCCTCAAT   60
CCCTCTGGGAT TTTTTCCTCGA TCACCAAGTG GACCCCTGCGT TCGGAGCCAA CTCAAACAAT   120
CCAGATTGGG ACTTCAACCC CAACAAGGAT CACTGGCCAG AGGCAATCA GGTAGGAGCG   180
GGAGCATTTCG GGCAGGGTT CACCCACCA CACGGCGGTC TTTTGGGGTG GAGCCCTCAG   240
GCTCAGGGCA TATTGACCAC AGTGCCAGCA GCGCCTCCTC CTGCTCCAC CAATCGGCAG   300
TCAGGAAGAC AGCCTACTCC CATCTCTCCA CCTCTAAGAG ACAGTCATCC TCAGGCC   357

```

【0053】

配列番号: 16

配列の長さ: 165

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to genomic RNA (PreS2 insert)

```

ATGCAGTGGG ACTCCACCAC ATTCCACCA GCTCTGCTAG ATCCCAGAGT GAGGGGCCTA   60
TATTTTCCTG CTGGTGCTC CAGTTCGGG ACAGTAAACC CTGTTCCBAC TACTGCCICA   120
CCCATATCGT CAATCTTCTC GAGGACTGGG GACCCCTGCAC AGAAC   165

```

【0054】

配列番号: 17

配列の長さ: 261

配列の型: 核酸

トポロジー: 直線状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

```

ATGGATATCA ATGCTTCTAG AGCCTTAGCC AATGTGTATG ATCTACCAGA TGAITTCITT   60
CCAAAAATAG ATGATCTTGT TAGAGATGCT AAAGACGCTT TAGACGGTTA TTGGAAATCA   120
GATTCAATAA AGAAACATGT TTTGATTGCA ACTCACITTG TGGATCTTAT TGAAGACTTC   180
TGGCAGACTA CACAGGGCAT GCATGAAATA CCCGAATCCT TAAGAGCTGT TATACCTCCC   240
ACTACTACTC CTGTTCCACC G   261

```

【0055】

25  
配列番号: 18  
配列の長さ: 411  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直線状  
配列の種類: genomic DNA  
起源: ダックHBV

## 配列

379

GCTCATTGA AAGCTTATGC AAAAATTAAC GAGGAATCAC TGGATAGGGC TAGGAGATTG 60  
CTTTGGTGGC ATTACAACTG TTTACTGTGG GGAGAAGCTC AAGTTACTAA CTATATTTCT 120  
CGCTTGGCTA CTTGTTATC AACTCCTGAG AAATATAGAG GTAGAGATGC CCCGACCATT 180  
GAAGCAATCA CTAGACCAAT CCATGTGGCT CAGGGAGGCA GAAAAACAAC TACGGGTACT 240  
AGAAAACCTC GTGGACTCGA ACCTAGAAGA AGAAAAGTAA AAACCACAGT TGCTATGGG 300  
AGAAGACGTT CAAAGTCCCG GGAAGGAGA GCCCCTACAC CCCAACGTGC GGGCTCCCT 360  
CTCCACGTA GTTCGAGCAG CCACCATAGA TCTCCCTCGC CTAGGAAATA A 411

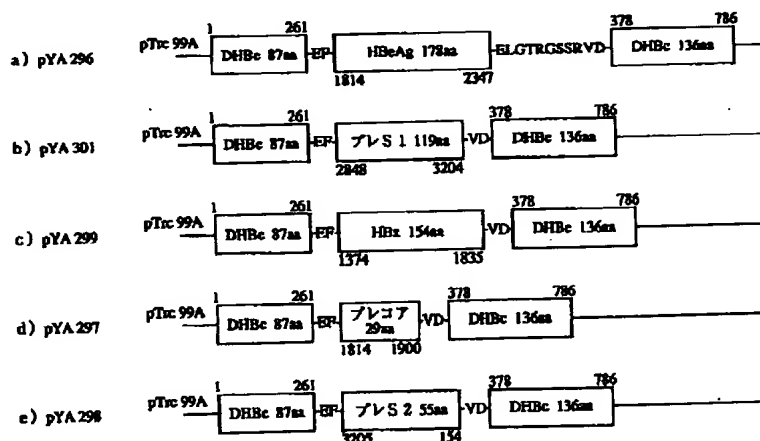
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 DHBc/ヒトHBV融合蛋白質の発現ベクターの模式図。a) HBe抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA296、b) プレS1抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA301、c) HBx抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA299、d) プレコア抗\*

\* 原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA297、e) プレS2抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA298をそれぞれ示す。図中、DHBc四角枠上部の数字はダックHBc遺伝子における塩基番号を、挿入されたヒトHBV各遺伝子の四角枠下部の数字はヒトHBV遺伝子における塩基番号をそれぞれ示す。

【図1】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C12N 15/09

G01N 33/569

33/576

識別記号

ZNA

片内整理番号

L

B

F I

技術表示箇所